

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang lingkup penelitian**

Ruang lingkup keilmuan dari penelitian ini adalah Histologi, Patologi Anatomi, Ilmu Gizi, dan Farmakologi.

#### **4.2 Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Negeri Semarang sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum (SPBU) Tugu Suharto Sampangan, Semarang sebagai tempat perlakuan terhadap hewan coba. Bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Dr. Kariadi sebagai tempat pembuatan preparat dan pemeriksaan. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebagai tempat analisis preparat dan Laboratorium Akademi Analisis Kesehatan 17 Agustus 1945 Semarang sebagai tempat pemeriksaan kadar Hb. Penelitian telah dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2015.

#### **4.3 Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini berjenis *true experimental dengan rancangan post test only controlled group design*. Perlakuan yang diberikan yaitu susu kambing yang diberikan pada tikus wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram

yang terpapar asap kendaraan bermotor dengan hasil berupa gambaran mikroskopis paru dan kadar Hb tikus wistar.

#### **4.4 Populasi dan sampel**

##### **4.4.1 Populasi target**

Populasi target penelitian ini adalah tikus wistar.

##### **4.4.2 Populasi terjangkau**

Populasi terjangkau penelitian ini adalah tikus wistar usia 2 - 3 bulan dengan berat badan 100 - 200 gram yang diperoleh dari pemeliharaan hewan coba *Rattus Breeding Center* (RBC) di Malang.

##### **4.4.3 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah tikus wistar usia 2 – 3 bulan dengan berat badan 100 - 200 gram yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

- 1) Tikus wistar
- 2) Usia 2 bulan
- 3) Jantan
- 4) Berat badan 100-200 gram
- 5) Sehat (aktif dan tidak cacat)

Kriteria eksklusi :

- 1) Mati selama proses aklimatisasi

#### **4.4.4 Cara sampling**

Sampel penelitian diambil secara acak dengan metode randomisasi sederhana (*simple random sampling*) dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

#### **4.4.5 Besar sampel**

Penentuan besar sampel berdasarkan ketentuan WHO dengan jumlah sampel minimal tiap kelompok 5 ekor binatang coba. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus wistar yang dibagi dalam 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok.

### **4.5 Variabel penelitian**

#### **4.5.1 Variabel bebas**

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian susu kambing

#### **4.5.2 Variabel terikat**

Variabel terikat adalah gambaran mikroskopis paru dan kadar hemoglobin darah tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor.

#### 4.6 Definisi operasional

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi operasional	Skala	Satuan
<b>A Variabel bebas</b>				
1.	Susu kambing	Susu kambing bubuk dengan dosis 473,2 mg/KgBB <sup>20</sup> yang dilarutkan dalam 1 ml air kemudian diberikan pada kelompok tikus wistar perlakuan 2 (P2) dengan bantuan sonde satu kali sehari sebelum paparan asap kendaraan bermotor di SPBU dan dilakukan selama 30 hari waktu perlakuan.	Nominal	Miligram (mg)
<b>B Variabel terikat</b>				
1.	Gambaran mikroskopis paru tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor	Gambaran mikroskopis paru tikus wistar dibawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan dengan <i>hematoxyllin eosin</i> . Pengamatan dilakukan terhadap sel limfosit untuk menentukan derajat infiltrasi sel radang, oedema paru dan destruksi alveoli menggunakan kriteria <i>Hansel dan Barnes</i> dalam 5 lapangan pandang yang dilihat pada keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 400x.	Ordinal	Ringan Sedang Berat

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel (Lanjutan)

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala	Satuan
2.	Kadar hemoglobin tikus wistar yang terpapar asap kendaraan bermotor	Kadar Hb tikus wistar diukur dengan menggunakan metode fotoelektrik (sianmethemoglobin)	Rasio	Gram per desiliter (gr/dl)

#### 4.7 Cara pengumpulan data

##### 4.7.1 Bahan

- 1) Tikus wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram
- 2) Asap kendaraan bermotor di SPBU
- 3) Susu kambing bubuk
- 4) Makanan dan minum
- 5) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan
  - a. Larutan buffer formalin 10%
  - b. Parafin
  - c. Hematoksilin eosin
  - d. Albumin
  - e. Larutan xylol
  - f. Aquades
  - g. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%

##### 4.7.2 Alat

- 1) Kandang tikus wistar beserta botol minum dan tempat pakan

- 2) Sonde lambung
- 3) Satu set alat bedah minor (untuk mengambil organ tikus)
- 4) Alat untuk proses mikroteknik pembuatan preparat histologi
  - a. Deckglass
  - b. Objek glass
  - c. Mikrotom
  - d. Oven
  - e. Cetakan parafin
- 5) Mikroskop cahaya untuk melihat preparat histologi
- 6) Alat untuk mengambil darah tikus
  - a. Gunting
  - b. Tabung dengan EDTA
  - c. Pipet pasteur/pipet hematokrit
- 7) Alat untuk mengukur kadar hemoglobin dalam darah
- 8) Neraca O'house
- 9) Botol-botol dan label

#### **4.7.3 Jenis data**

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis paru dan kadar Hb darah tikus wistar usia 2 bulan dari kelompok perlakuan yang diberi paparan asap kendaraan bermotor + susu kambing dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P1) yang diberi paparan asap kendaraan bermotor saja (P2) dan kelompok kontrol.

#### 4.7.4 Cara kerja

Penelitian ini menggunakan 15 tikus wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 100 – 200 gram yang telah di aklimatisasi dengan dikandangkan perkelompok dan diberi makan standar dan minum yang sama secara *ad libitum* selama 7 hari. Kelompok kontrol merupakan kelompok tikus wistar yang tidak diberi perlakuan apa-apa, hanya diberi makanan dan minuman standar. Kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 adalah kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan 1 diberi paparan asap kendaraan bermotor di SPBU selama 8 jam, kelompok perlakuan 2 diberi susu kambing dengan dosis 473,2 mg/KgBB sebelum pemaparan asap kendaraan bermotor di SPBU selama 8 jam. Pemaparan asap kendaraan bermotor dilakukan di SPBU Tugu Suharto Sampangan, Semarang. Pemberian susu kambing dan pemaparan asap kendaraan bermotor selama 8 jam dilakukan selama 30 hari.

Hari ke-31 dilakukan pengambilan *whole blood* tikus wistar dari vena retroorbital, diterminasi dan dilakukan bedah minor untuk mengambil organ paru. *Whole blood* tikus wistar yang telah diambil ditambah dengan EDTA dan dilakukan pengukuran kadar Hb dengan menggunakan metoda fotoelektrik (sianmethemoglobin). Organ paru tikus wistar yang telah diambil kemudian diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan menggunakan hematoksilin eosin. Masing-masing preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang, yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 400x, serta dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk dinilai tingkat kerusakan parunya.

Derajat kerusakan paru ditentukan dengan adanya oedema alveolus, destruksi dinding alveoli, dan infiltrasi sel radang.

1) Oedema alveolus

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi struktur perubahan histologis

1 = oedema pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = oedema pada sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

3 = oedema pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

2) Destruksi septum alveolar

Dengan skoring :

0 = tidak terjadi perubahan struktur histologis

1 = destruksi septum alveolar pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = destruksi septum alveolar pada sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

3 = destruksi septum alveolar pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

3) Infiltrasi sel radang

Dengan skoring :



0 = tidak terjadi perubahan struktur histologis

1 = infiltrasi sel radang pada kurang dari sepertiga dari seluruh lapangan pandang

2 = infiltrasi sel radang pada sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapangan pandang

3 = infiltrasi sel radang pada lebih dari dua pertiga dari seluruh lapangan pandang.

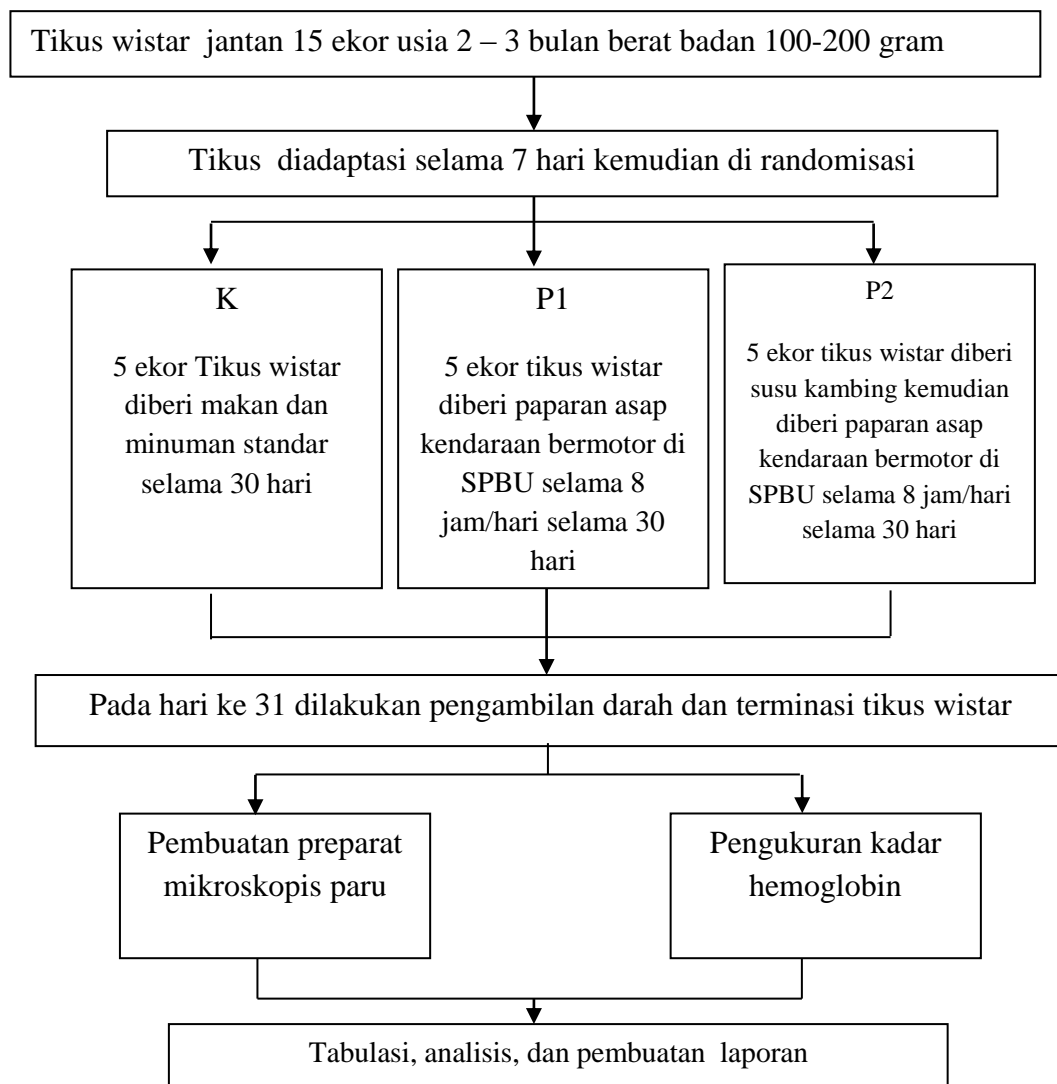
Kriteria penilaian derajat kerusakan alveolus

Tabel 6. Kriteria Penilaian Derajat Kerusakan Alveolus Paru menurut Hansel dan Barnes.<sup>50</sup>

Kriteria	Keterangan	Nilai Variasi
Normal	Tidak terdapat kerusakan histologis	0
Kerusakan ringan	Kerusakan alveolus paru >0% - <30% dari seluruh lapangan pandang	1
Kerusakan sedang	Kerusakan alveolus paru >30% - <60% dari seluruh lapangan pandang	2
Kerusakan berat	Kerusakan alveolus paru >60% dari seluruh lapangan pandang	3

Kadar hemoglobin dinilai menggunakan kriteria dari Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarian Kadar hemoglobin normal pada tikus wistar jantan antara 13,4 – 15,8 g/dl.<sup>51</sup>

#### 4.8 Alur penelitian



Gambar12. Alur penelitian

Keterangan :

K : Kelompok I. Kelompok kontrol, 5 ekor tikus wistar diberi makanan dan minuman standar selama 30 hari

- P1 : Kelompok II. Kelompok perlakuan 1, 5 ekor tikus wistar diberi paparan asap kendaraan bermotor di SPBU selama 30 hari. Lama paparan per hari adalah 8 jam.
- P2 : Kelompok III. Kelompok perlakuan 2, 5 ekor tikus wistar diberi susu kambing dengan dosis 473,2 mg/KgBB kemudian diberi paparan asap kendaraan bermotor di SPBU selama 30 hari. Lama paparan per hari adalah 8 jam.

#### **4.9 Analisis data**

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan program komputer *SPSS for Windows*. Data dengan skala rasio diuji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Data dengan sebaran normal diteruskan dengan uji parametrik *One-Way Anova*. Data yang sebarannya tidak normal diteruskan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Data dengan skala ordinal diuji menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, apabila didapatkan hasil yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan *Post Hoc* menggunakan uji *Mann Whitney*.

#### **4.10 Etika penelitian**

Penelitian ini telah mendapatkan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran dan Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang.

#### 4.11 Jadwal penelitian

Tabel 7. Jadwal penelitian

No	Kegiatan	Bulan ke-							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Survey awal dan penentuan lokasi penelitian								
2	Penyusunan proposal								
3	Seminar proposal								
4	Pelaksanaan penelitian								
5	Pengolahan data, analisis, dan penyusunan laporan								
6	Seminar hasil								